

## **Deteksi Molekuler Ekson 3 Gen Beta Globin pada Pasien Beta Talasemia Mayor di RSUD DR. Soeroto Ngawi menggunakan Metode *Polymerase Chain Reaction- Single Strand Conformation Polimorfism***

### **Molecular Detection of Exon 3 of Beta Globin Gene from Thalassemia Beta Major Patients in RSUD DR. Soeroto Ngawi using Polymerase Chain Reaction–Single Strand Conformation Polimorfism Method**

Choirul Huda<sup>1</sup>, Ana Indrayati<sup>2</sup>, Elfahmi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>STIKES Karya Putra Bangsa, Jl. Raya Tulung Agung, Blitar Km. 04,

<sup>2</sup>Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi Surakarta, Jl. Letjen Sutoyo, Mojosongo, Surakarta-57127,

<sup>3</sup>Sekolah Farmasi, Insitut Teknologi Bandung, Jl. Ganesa No.10 Bandung-40132

email: [hudacoy85@gmail.com](mailto:hudacoy85@gmail.com)

---

#### **Abstrak**

Talasemia merupakan penyakit genetik yang menyebabkan gangguan sintesis rantai globin, komponen utama molekul hemoglobin. Sintesis rantai globin yang tidak seimbang menyebabkan penurunan produksi sel darah merah.

Penelitian ini bertujuan mengetahui adanya mutasi pada ekson 3 gen beta globin pasien talasemia menggunakan metode PCR. Sebanyak 5 sampel diisolasi DNANYA dan dilanjutkan amplifikasi menggunakan primer forward 8 dan primer reverse 9 dengan target sebesar 214 bp. Hasil amplifikasi dielektroforesis, disekuensing dan dianalisis jenis mutasinya dengan metode SSCP.

PCR-SSCP dapat digunakan untuk menganalisis terjadinya mutasi pada ekson 3 gen beta globin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa, dari kelima sample yang dianalisa tidak ditemukan mutase pada ekson 3 gen beta globin.

**Kata kunci :** talasemia, ekson 3, PCR-SSCP

---

#### **Abstract**

Talasemia is a genetic disease that causes globin chain synthesis disorder, a major component of the hemoglobin molecule. With the synthesis of unbalanced globin chains will decrease the production of red blood cells.

This study aims to determine the presence of mutations in exon 2 gene beta globin thalassemia patients using PCR method, where 5 samples in DNA isolation and continued PCR amplification, the amplification result of electrophoresis region 2 beta globin gene Region II is the result of amplification of primary 4 and primer primer reverse 5 with a target of 350 bp, on PCR there is amplification or doubling of the desired DNA sequence based on the primary selection for the reaction, the PCR product of each of these regions which is subsequently performed by SSCP.

PCR-SSCP could analysis the mutation in exon 3 beta globin genes. In the PCR-SSCP result, there was no mutation in region 4 exon 3 in five samples but probably there was mutation in another regions.

**Keywords:** thalassemia, beta thalassemia, pcr

---

#### **PENDAHULUAN**

Talasemia merupakan penyakit genetik yang menyebabkan gangguan

sintesis rantai globin, komponen utama molekul hemoglobin (Hb). Eritrosit mengandung hemoglobin yang tersusun

atas heme dan globin. Hemoglobin dewasa atau HbA ( $\alpha 2\beta 2$ ) terdiri atas dua tipe protein globin yaitu alfa dan beta. Penurunan sintesis protein globin akan memicu munculnya gejala talasemia. Penurunan jumlah alfa-globin yang disebabkan oleh mutasi gen hemoglobin alfa (HBA) pada kromosom 16 disebut alfa-talasemia sedang penurunan pada b-globin oleh mutasi gen hemoglobin beta (HBB) pada kromosom 11 akan berakibat pada beta-talasemia. Prevalensi beta-talasemia di Indonesia lebih tinggi dibanding dengan alfa-talasemia (Nur Afni Suraya B, 2015). Penderita talasemia yang melakukan transfusi darah secara rutin dapat meningkatkan zat besi dalam tubuh (Weatherall, 1997). Salah satu cara yang sering digunakan untuk mengetahui pembawa sifat beta-talasemia adalah dengan analisis hematologi. Pembawa sifat beta-talasemia dapat dilihat dengan gejala mikrositik dan penurunan jumlah Hb pada eritrosit (Cao dan Galanello, 2010). Metode PCR-SSCP sebagai metode untuk mendeteksi mutasi pada pasien beta-talasemia mayor. Metode ini telah dikembangkan untuk mendeteksi adanya mutasi pada pembawa sifat talasemia (Priyambodo, 2014; Onggo, 2014). Individu yang terdiagnosa individu beta-talasemia mayor di RSUD Dr. Soeroto Kabupaten Ngawi dilakukan pemeriksaan Hb elektroforesis untuk penentuan diagnosanya dan belum adanya pemeriksaan molekuler untuk mengetahui jenis dan letak mutasi. Analisis PCR-SSCP terhadap individu beta-talasemia menunjukkan adanya

mutasi pada gen beta globin (Priyambodo, 2014). Sehubungan dengan hal tersebut, maka tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui mutasi pada ekson 3 gen beta globin pada pasien pada pasien beta-talasemia mayor dengan metode PCR-SSCP.

## METODE PENELITIAN

### Alat dan Bahan

#### 1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi serangkaian alat gelas berupa gelas Beker, gelas ukur, Erlenmeyer, pipet tetes, corong, pengaduk, pipet ukur, *pipet pump*, *microcentrifuge tube* (*microtube*) 1,5 mL dan 0,2 mL, mikropipet, neraca analitik, vorteks sentrifuga, inkubator, *microwave*, lemari pendingin, rangkaian alat elektroforator horizontal, UV transiluminator, *thermocycler*, fluorometer dan kamera

#### 2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah 10 sampel darah pasien talasemia yang rutin melakukan tranfusi di RSUD Dr. Soeroto Kabupaten Ngawi, disimpan dalam *tube BD vacutainer* EDTA dan satu sampel normal atau kontrol negatif digunakan sebagai pembanding dalam penelitian. Bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi akuades steril, *Geneaid Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell)*, *PCR master mix KAPA 2G fast ready mix*, primer *forward* dan *reverse* spesifik untuk pada gen beta globin, *DNA loading dye*, *Geneaid 100 bp plus DNA ladder*, *fluorocet*, gel agarosa, etanol absolut 96%, *buffer* Tris Borat EDTA (TBE), *loading buffer* (campuran *bromo phenol blue*,

formamide, EDTA, gliserol), gel poliakrilamid (acrylamide:bis-acrylamide 29:1) dan etidium bromida.

Jalannya Penelitian



## 1. Pengambilan Sampel

Sampel darah diperoleh dari pasien beta thalasemia mayor yang rutin melakukan transfusi di RSUD Dr. Soeroto kabupaten Ngawi. Sampel darah disimpan dalam tabung *vacutaine* EDTA 3 ml dan dimasukkan dalam freezer-20°C.

### 1. Isolasi DNA

Isolasi DNA sampel dilakukan dengan GSYNC™ DNA Ekstraktion kit sesuai dengan protocol kit. Langkah-langkah isolasi DNA sebagai berikut

#### a. Lisis Sel

Sebanyak 200 µl sampel darah diambil dan dimasukkan dalam tabung

microtube 1,5 ml dan menambahkan 20 µl Proteinase-K dan di inkubasi pada suhu 60°C selama 5 menit, kemudian ditambahkan GB *buffer* sebanyak 200 µl dan dihomogenkan dengan vortex. Selanjutnya sampel diinkubasi pada suhu 60°C selama 5 menit, selama inkubasi microtube dibolak-balik selama 2 menit.

#### b. Pengikatan DNA

Setelah inkubasi selesai, sebanyak 200 µl etanol absolut ditambahkan dalam sampel lalu divortex kemudian dipindahkan dalam *purification column* (kolom GD) yang diletakkan dalam tabung pengumpul berukuran 2 ml. Sampel kemudian dipindahkan dalam kolom GD. Sampel selanjutnya di sentrifugasi pada 12.000 rcf selama 5 menit kemudian larutan hasil sentrifugasi dibuang dan kolom GD ditempatkan pada tabung pengumpul yang baru.

#### c. Pencucian

Sebanyak 400 µl *wash buffer* 1 ditambahkan ke dalam kolom GD dan disentrifugasi pada 12.000 rcf selama 2 menit. Larutan sisa pencucian pada tabung pengumpul dibuang. Kolom GD dimasukan ke dalam tabung pengumpul yang baru dan ditambahkan 600 µl *wash buffer* II dan selanjutnya disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 2 menit. Larutan sisa pencucian dalam tabung pengumpul dibuang, kemudian kolom GD disentrifugasi lagi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 4 menit.

#### d. Pengelusan

Setelah selesai, kolom GD ditempatkan dalam tabung *microtube* 1,5 ml,

kemudian ditambahkan 75 µl buffer elusi yang diinkubasi pada suhu 60 °C. Selanjutnya larutan diinkubasi pada suhu kamar selama 5 menit dan disentrifugasi pada 12.000 rcf selama 2 menit. Proses elusi diulangi 2 kali untuk memaksimalkan pelepasan DNA dari silica gel pada *kolom GD*. Selanjutnya, *kolom GD* dikeluarkan dari microtube 1,5 mL dan disimpan di dalam lemari pendingin.

## **2. Fluorometer dan Elektroforesis DNA**

Pada penelitian ini digunakan uji kuantitatif dengan metode fluorometri, Qubit fluorometer adalah perangkat kuantifikasi DNA yang didasarkan pada intensitas fluoresensi dari label fluorosen yang mengikat DNA beruntai ganda (sdDNA) (Nakayama *et al.* 2016), selanjutnya skema fluorometer disiapkan microtube berisi sampel dan 2 microtube tambahan untuk standard atas dan bawah (nol). Selanjutnya dilakukan pembuatan larutan uji (Working Solution) dengan cara : Larutan dihomogenasikan dengan vortex selama 2-3 detik, dipastikan tidak ada gelembung terbentuk. Larutan standard dibuat dengan cara Sebanyak 1-20 µL sampel dicampurkan dengan 199-180 µL larutan uji untuk mendapatkan larutan dengan volume akhir 200 µL. Microtube berisi sampel divortex selama 2-3 detik tanpa terbentuk gelembung kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 2 menit. Setelah itu, dilakukan pembacaan dengan mesin Qubit yang telah dinyalakan. Larutan uji dibaca terlebih

dahulu selanjutnya sampel. Microtube dimasukkan pada Qubit fluorometer kemudian ditekan "Read" dan ditekan "Save" untuk menyimpan data.

Selanjutnya, uji kualitatif dengan elektroforesis pada gel agarosa 0,8%. Mula-mula sebanyak 0,32 gram agarosa ditimbang kemudian ditambahkan 40 mL Tris Borate-EDTA (TBE) 1X dan dilarutkan sampai homogen. Larutan tersebut dipanaskan dalam microwave selama 30 detik. Setelah sedikit dingin ditambahkan *fluoroceft* sebanyak 2 µL dan dilarutkan hingga homogen. Gel dituang pada cetakan yang telah diberi sisir untuk sumuran. Gel didiamkan hingga mengembang lalu sisir dilepas dan gel dipindahkan ke dalam alat elektroforesis dan ditambahkan dengan TBE 1x hingga gel terendam.

Sumuran pertama diisi sebanyak 3,5 µL marker DNA berupa 100 pb. Hasil isolasi DNA diambil sebanyak 5 µL dan dicampur dengan 1 µL (6x) *loading dye*. Campuran DNA dan *loading dye* dimasukkan dalam sumuran gel agarosa. Elektroforesis DNA dilakukan dengan menghubungkan katoda dan anoda pada sumber tegangan 100 volt selama 15 menit. Pengamatan pita DNA dilakukan dengan menggunakan UV transiluminator.

## **3. Amplifikasi Region IV Gen $\beta$ -globin**

Hasil isolasi DNA akan digunakan sebagai cetakan pada proses amplifikasi dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR). PCR dilakukan berdasarkan prosedur KAPA Biosystem (2013). PCR mix dibuat dengan

menggunakan PCR *Master mix KAPA2G fast ready mix*, Setelah semua komponen dimasukan ke dalam tabung PCR, selanjutnya dimasukan ke dalam mesin *thermal cycler*. Kondisi siklus PCR yang digunakan untuk amplifikasi gen  $\beta$ -globin adala sebagai berikut: (Pryambodo, 2014)

#### 4. Elektroforesis Hasil Amplifikasi PCR

Hasil PCR dielektroforesis pada gel agarosa dengan konsentrasi 2%. Sebanyak 0,8 gram agarosa ditimbang kemudian ditambahkan 100 mL Tris Borate-EDTA (TBE) 1X dan dilarutkan sampai homogen. Larutan tersebut dipanaskan dalam *microwave* selama 50 detik. Setelah sedikit dingin ditambahkan *fluoroceft* sebanyak 3,5  $\mu$ L dan dilarutkan hingga homogen. Gel dituang pada cetakan yang telah diberi sisir untuk sumuran. Gel didiamkan hingga mengembang lalu sisir dilepas dan gel dipindahkan ke dalam alat elektroforesis dan ditambahkan dengan TBE 1x hingga gel terendam.

Sumuran pertama diisi dengan sebanyak 3  $\mu$ L marker DNA berupa 100 pb. Sampel diambil sebanyak 4  $\mu$ L dan dimasukkan dalam sumuran gel agarosa. Elektroforesis DNA dilakukan dengan menghubungkan katoda dan anoda pada sumber tegangan 50 volt. Elektroforesis dihentikan setelah migrasi DNA mencapai 2/3 panjang gel yang ditunjukkan dengan warna biru pada gel agarosa. Pengamatan pita DNA dilakukan dengan menggunakan UV Transiluminator.

#### 5. Analisis PCR-SSCP

Analisis *polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism* (PCR-SSCP) dilakukan berdasarkan metode Fitriani (2009) dengan modifikasi sebagai berikut :

##### a. Pembuatan gel

Larutan gel disiapkandengan Erlenmeyer 125 ml yang terdiri atas 5,6 ml aquabides 2,6 ml, poliakrilamid 30% (akrilamid : bisaakrilamid 29:1), 1 ml TBE 10x, 0,68 ml gliserol 87%, 45  $\mu$ l ammonium persulfat 10%, dan 10  $\mu$ l *tetramethyl ethylene diamine* (TEMED). Setelah TEMED ditambahkan, larutan gel dihomogenkan, selanjutnya segera dituangkan dengan menggunakan mikropipet ke dalam cetakan. Sisir dipasang pada cetakan dan gel dibiarkan selama 60 menit.

Setelah 60 menit, gel dipasang pada tangki elektroforator vertikal dan ditambahkan TBE 1,5x hingga mencapai batas kolom. Sisir diangkat dengan hati-hati dan dilakukan *pre-running* selama 20 menit.

##### b. Penyiapan sampel

Sebanyak 10  $\mu$ l produk PCR ditambahkan 15  $\mu$ l *loading buffer* dihomogenasi dengan vortex. Campuran sampel dan *loading buffer* dipanaskan dalam *waterbath* pada suhu 95°C selama 10 menit untuk denaturasi. Setelah proses denaturasi, sampel segera dimasukkan *freezer* suhu -20°C selama 10 menit. Setelah proses thawing, sebanyak 25  $\mu$ l campuran tersebut dimasukkan kedalam masing-masing sumuran gel. Elektroforesis

dilakukan dengan TBE 0,5x pada 100V 50mA selama 100 menit.

c. Pewarnaan

Gel dilepas dari gelas, lalu diencerkan dalam larutan *etidium bromida* selama 45 menit dan diamati dengan UV transilluminator. Hasil didokumentasikan dengan kamera digital.

d. Interpretasi hasil

Interpretasi data dilakukan dengan mendeskripsikan pita hasil SSCP dengan membandingkan perbedaan jarak migrasi pita (*Single strand DNA*) subyek yang diteliti dengan individu normal. Individu yang memiliki genotip homozigot, baik homozigot dominan maupun resesif menunjukkan dua pita DNA pada gel, sedangkan individu heterozigot menunjukkan tiga atau empat pita DNA.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### A. Identifikasi Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah darah pasien beta talasemia mayor di RSUD Dr. Soeroto, Kabupaten Ngawi, Jawa Timur, pengambilan sampel

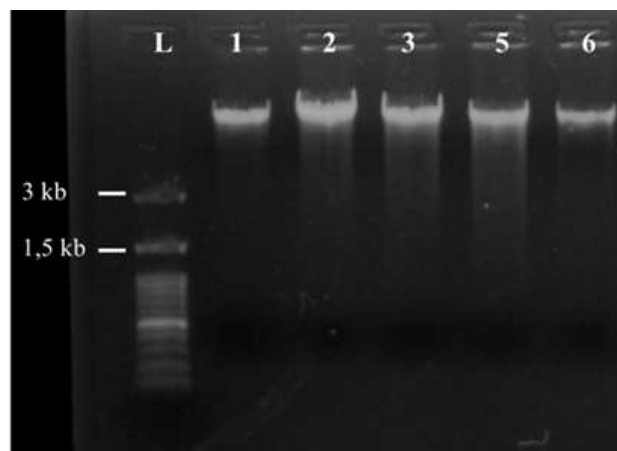
menggunakan prosedur yang memenuhi kelayakan etik atau *Ethical Clearance*.

### B. Pengambilan Sampel

Sampel darah diambil dari 5 (sembilan) pasien beta talasemia mayor yang rutin melakukan transfusi darah di RSUD Dr. Soeroto, Kabupaten Ngawi. Pengambilan sampel dilakukan di Instalasi Laboratorium RSUD Dr. Soeroto, Kabupaten Ngawi. Sampel darah yang telah diambil disimpan dalam tabung *vacutaine* EDTA 3 ml dan dimasukkan dalam freezer -20°C.

### C. Hasil Isolasi DNA

Lima sampel dilakukan isolasi DNA menggunakan *gSYNC™ DNA Ekstraktion (Blood Protocol Prosedur)*. Isolasi DNA dilakukan dengan mengekstraksi DNA dari darah beku yang telah ditambahkan zat antikoagulan (EDTA). Hasil uji kualitatif dan kuantitatif DNA genom dapat dilihat di gambar 1. Uji kualitatif DNA dilakukan dengan *running* elektroforesis pada gel agarosa dengan konsentrasi 0,8%. Metode fluorometri di pakai untuk uji kalitatif DNA sehingga dapat diketahui konsentrasi DNA hasil isolasi.



Gambar 1. Hasil elektroforesis isolasi DNA sampel penelitian

**Tabel 1. Konsentrasi DNA sampel**

No	Nama Sampel	Konsentrasi (ng/ $\mu$ l)
1	Sampel 1	63,6
2	Sampel 2	68
3	Sampel 3	82
4	Sampel 5	70,8
5	Sampel 6	62

Hasil elektroforesis kesembilan sampel memperlihatkan pita DNA yang sangat jelas, menunjukkan keberadaan DNA dan keberhasilan isolasi DNA yang dilakukan. Selain 5 sampel diatas, satu sampel normal (N) dan satu sampel control positif (K+) juga dilakukan isolasi, namun tidak pada hasil elektroforesis yang berbeda. Sampel normal digunakan sebagai kontrol negative mutasi. Sampel K+ yang digunakan merupakan sampel darah pasien talasemia yang telah diketahui mutasinya melalui sekuensing DNA. Kedua kontrol ini digunakan untuk mengevaluasi setiap tahapan metode dari uji molekuler yang akan dilakukan.

Ukuran genom manusia berdasarkan *International Human Genome Sequencing Consortium* secara keseluruhan diestimasikan 2.916 gb, dengan ukuran molekul DNA pada 23 kromosomnya berkisar dari 21,8 mg (kromosom Y) hingga 2692,9 mg (kromosom 1) dan molekul DNA pada mitokondria yang berukuran 16.569 bp (Lander *et al.*, 2001). Dikarenakan ukuran DNA nya yang besar sehingga pada hasil elektroforesis pita DNA genom sampel terlihat jauh diatas *marker*. Ketebalan pita hasil

elektroforesis yang beragam menunjukkan perbedaan konsentrasi hasil isolasi DNA yang dilakukan.

Nilai konsentrasi DNA hasil isolasi sampel dengan metode fluorometri menggunakan Qubit Fluorometer ditampilkan pada Tabel 1. Pada sampel, konsentrasi DNA berkisar 55,2-82 ng/ $\mu$ L. Qubit Fluorometer adalah perangkat kuantifikasi DNA yang didasarkan pada intensitas fluoresensi dari label fluorosen yang mengikat DNA beruntai ganda (sdDNA) (Nakayama *et al.* 2016).

Sampel DNA menunjukkan seri konsentrasi yang berbeda. Setiap sel diploid manusia mengandung sekitar 6 pg DNA. Untuk isolasi DNA dari darah tepi umumnya diperoleh 30 ng/ $\mu$ L hingga 60 ng/ $\mu$ L dari 1 ml darah yang berasal dari 5-10 juta leukosit (Baechtel, 1989). Secara umum konsentrasi yang diperoleh relative sesuai referensi diatas. Perbedaan konsentrasi DNA dapat disebabkan karena kualitas darah sampel yang berbeda salah satunya dikarenakan beda waktu saat penyimpanan darah.

#### **D. Hasil amplifikasi region gen beta globin**

Amplifikasi perlu dilakukan pada region IV sebelum prosedur SSCP dengan elektroforesis vertical dilakukan. Pembagian region pada penelitian ini mengacu berdasarkan Gupta and Argawal (2003) dengan hanya 3 region saja yang digunakan yaitu region I, II dan IV. Pemilihan 3 region ini didasarkan atas keberadaan daerah ekson pada ketiga region tersebut. Mutasi yang

terjadi pada ekson dapat menyebabkan kesalahan translasi pada sintesis asam amino sehingga dapat memberikan efek secara langsung pada rantai beta globin yang disintesis. Proses amplifikasi atau perbanyakan DNA dilakukan dengan metode PCR.

Amplifikasi atau penggandaan sekuen DNA yang diinginkan berdasarkan pemilihan *primer* untuk reaksi. Penggandaan DNA secara alami terjadi pada organisme melalui proses replikasi DNA dengan DNA helikase berperan dalam membuka pita ganda DNA sehingga DNA polimerase dapat memulai penggandaan. Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan primer untuk melipatgandakan daerah ekson II pada gen HBB penyandi beta globin. DNA hasil isolasi kemudian dijadikan template dalam proses amplifikasi. Amplifikasi dilakukan pada daerah IV gen beta globin, karena daerah tersebut merupakan tempat ekson III. Amplifikasi menghasilkan ukuran aplikon 214 pb, yang meliputi daerah 3' *Untranslated Region* (UTR), seluruh daerah ekson III dan sebagian daerah intron II atau

*Intervening Sequence* (IVS) II gen beta globin. Produk amplifikasi kemudian dianalisis dengan elektroforesis pada agarosa konsentrasi 0,8% untuk memastikan ada tidaknya ampikon target.

Hasil produk PCR dari region IV selanjutnya dilakukan SSCP. Visualisasi hasil produk PCR pada region IV ditampilkan pada Gambar 2.

Pada gambar 2 menunjukkan hasil amplifikasi dari region IV gen beta globin. Region IV merupakan hasil amplifikasi dari primer forward 8 dan primer reverse 9 dengan target yaitu 214 bp. Region ini mencakup sebagian daerah intron 2, seluruh daerah ekson III dan sebagian daerah 3' UTR.

#### E. Hasil SSCP region gen beta globin

*Single Strand Conformation Polymorphism* atau SSCP merupakan teknik untuk mendeteksi mutasi gen. SSCP digunakan untuk melihat pola migrasi untai tunggal DNA pada gel poliakrilamid. Setiap ampikon DNA pada region IV dipisahkan dalam gel



Gambar 2. Hasil elektroforesis region IV gen beta globin pada sampel

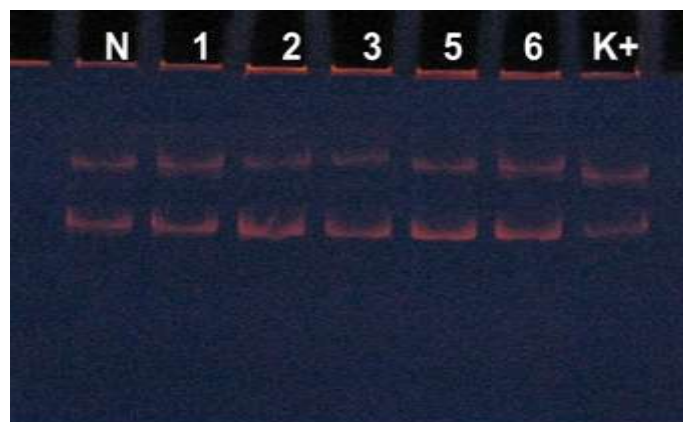


poliakrilamid selanjutnya diwarnai dengan *ethidium bromide*. Prinsip dasar dari SSCP adalah fakta bahwa *single strand* DNA (ssDNA) memiliki konformasi tertentu. Perubahan konformasi karena adanya perubahan basa pada sekuen DNA dapat menyebabkan perbedaan migrasi ssDNA pada elektroforesis sehingga DNA wild-type atau normal dan DNA yang mengalami mutasi akan menunjukkan pola pita yang berbeda. Tahapan analisis SSCP sendiri terdiri dari : 1). Amplifikasi target DNA dalam hal ini yaitu region IV gen beta globin, 2). Denaturasi dsDNA dari produk PCR menjadi ssDNA dengan penambahan agen denaturasi (formamida) dan pemanasan, 3). Pendinginan hasil denaturasi DNA yaitu ssDNA untuk memaksimalkan *self-annealing* sehingga membentuk konformasi

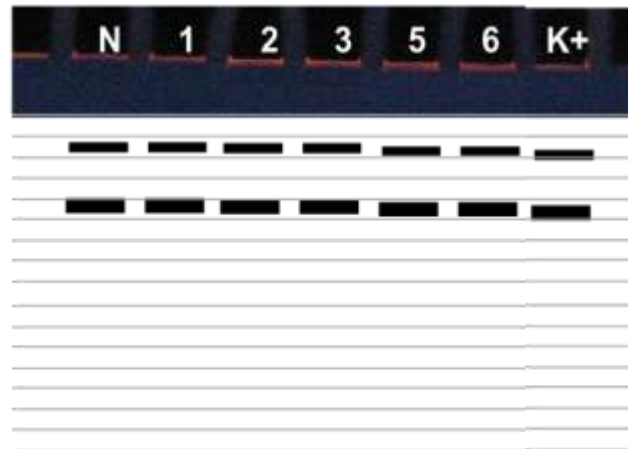
tertentu 4). Deteksi perbedaan migrasi konformasi ssDNA pada elektroforesis kondisi non denaturasi (Dong dan Zhu, 2005). Elektroforesis yang dilakukan adalah *Polyacrilamide Gel Electrophoresis* konsentrasi 39,7% dengan elektroforator vertical. Analisis hasil SSCP pada region IV yang didalamnya juga termasuk bagian ekson III ditampilkan pada gambar 3.

Pada region IV gen beta globin yang telah dilakukan analisis SSCP, seluruh sampel dan sampel K<sup>+</sup> menunjukkan dua pita dengan pola yang sama dengan kontrol negative (sampel N). Hal ini menunjukkan berdasarkan analisis SSCP tidak ditemukan indikasi mutasi pada sekuen region tersebut.

Berdasarkan gambar 4, pada seluruh sampel bahkan pada sampel K<sup>+</sup> tidak ada indikasi mutasi.



**Gambar 3 Hasil SSCP region IV gen beta globin pada sampel pola pita pada gel poliakrilamid.**



**Gambar 4. Hasil SSCP region IV gen beta globin pada sampel skema pola pita gel poliakrilamid.**

### KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat ditarik kesimpulan bahwa metode PCR-SSCP tidak mendapatkan mutasi pada region IV dan pada ke lima sampel tidak terjadi mutasi gen pada daerah ekson 3 tapi dimungkinkan terjadi mutasi diregion lainnya.

### DAFTAR PUSTAKA

- Dong Y. Zhu H. 2005. Single-strand conformational polymorphism analysis: basic, principle and routine practice. *Methods Mol Med*; 108:149-157.
- F. S. Baechtel, 1989. The extraction, purification and quantification of DNA. in *Proceedings of the International Symposium on the Forensic Aspects of*
- Anonim, 2008, *Riset Kesehatan Dasar 2007*, Jakarta : Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., *et al.* 2001. Initial sequencing and analysis of human genome. *Nature*, 409: 860-920.

Nur Afni Suraya B, 2015. Analisis Sekuen IVS II Gen Beta-Globin pada Carrier Beta-Thalassemia. Universitas Gadjah Mada, 2015

Priyambodo dan Handayani, N.S.N., 2014, Deteksi mutasi Ekson 2 Gen  $\beta$ -Globin dan Daerah Pengapitnya Pada Pembawa Sifat  $\beta$ -Thalassemia dengan Metode *Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism*(PCR-SSCP), Prosiding Seminar Nasional dan Rapat Tahunan Bidang MIPA, Fakultas MIPA Institut Pertanian Bogor.